

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : <b>A61L 27/36</b>	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/25839</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Mai 2000 (11.05.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/08056  (22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 1999 (25.10.99)  (30) Prioritätsdaten: 198 49 984.1 29. Oktober 1998 (29.10.98) DE		(81) Bestimmungsstaaten: CA, CZ, IL, KR, NO, TR, US, ZA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>		
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): TU- TOGEN MEDICAL GMBH [DE/DE]; Industriestrasse 6, D-91077 Neunkirchen am Brand (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): KÜBLER, Norbert [DE/DE]; Auf der Schanz 62, D-97076 Würzburg (DE).  (74) Anwalt: MANITZ, FINSTERWALD & PARTNER GBR; Postfach 22 16 11, D-80506 München (DE).		

(54) Title: METHOD FOR PREPARING BONE MATERIAL

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR PRÄPARATION VON KNOCHENMATERIAL

**(57) Abstract**

The invention relates to a method for preparing bone material. According to said method, the demineralized bone material is subjected to an autolytic decomposition and an extraction of its cellular components while at the same time its osteoinductive matrix proteins are maintained. To this end, the bone material is incubated in a phosphate buffer solution in combination with a mixture of enzyme inhibitors. The dwelling time in the buffer solution does not exceed 24 hours.

**(57) Zusammenfassung**

Bei einem Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial wird das demineralisierte Knochenmaterial einem autolytischen Abbau sowie einer Extraktion seiner zellulären Komponenten unterworfen unter gleichzeitiger Erhaltung seiner osteoinduktiven Matrixproteine. Dies wird durch Inkubation in einer Phosphatpufferlösung in Kombination mit einer Mischung aus Enzyminhibitoren erreicht, wobei die Verweilzeit in der Pufferlösung 24 Stunden nicht überschreitet.

#### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial

5

Die Erfindung bezieht sich auf die Präparation und Gewinnung von demineralisiertem Knochenmaterial, das zur Wiederherstellung bei knöchernen Defekten in der Chirurgie geeignet ist.

10

Die Verwendbarkeit demineralisierten Knochenmaterials ist bereits bekannt. 1965 beschrieb M. R. Urist das osteoinduktive Potential von demineralisiertem Knochen nach intramuskulärer Implantation im Tierexperiment. Dieses Knochenmaterial enthält eine oder mehrere osteoinduktiv wirksame Substanzen wie z.B. die sogenannten bone morphogenetic proteins (BMPs), die eine Knochenregeneration in einem knöchernen Defekt stimulieren können (Lit. Urist, M.R.: Bone Formation by Autoinduction. Science 150: 893, 1965.).

15 20 Eine Verbesserung dieses osteoinduktiven Knochenmaterials wurde über die Jahre hinweg schrittweise erreicht. Durch die Erkenntnis, daß eine im phosphatgepufferten Medium geführte Aktivierung von endogenen Knochenzymen, die einen Abbau von osteoinduktiven Proteinen bewirken, durch verschiedene Enzyminhibitoren wie Natriumazid, Jodessigsäure, Jodacetamid, N-Ethylmaleimid, Phenylmethyl-sulfonylfluorid und p-Chlorquecksilberbenzoat, unterdrückt werden kann, ohne gleichzeitig die Autolyse von Knochenzellen zu beeinträchtigen, führte schließlich zu einem speziellen Herstellungsverfahren, mit dem ein sogenannter AAA-

Knochen, ein autolysierter, Antigen extrahierter, allogener Knochen, präpariert werden konnte (vgl. Kübler N., et al., J.Oral Maxillofac. Surg., 51: 1346-1357, 1993.). Dieser AAA-Knochen hat bei gleichzeitig reduzierter Allo-Antigenität osteoinduktive Eigenschaften. Die Reduzierung der antigenen Eigenschaften wird durch Behandlung der zellulären Bestandteile durch Autolyse sowie deren Extraktion mit Chloroform-Methanol erreicht. Hierbei wird Knochenmaterial, das einem Verfahren zur Herstellung als AAA-Knochen unterzogen wird, aus Verstorbenen gewonnen.

5

10 Die Gewinnung des Ausgangsmaterials für das demineralisierte Knochenmaterial aus Verstorbenen ist durch den Einfluß von nach dem Tode einsetzenden Zersetzungsvorgängen beschränkt. Diese Autolyse setzt unmittelbar post mortem ein und zerstört die für die beabsichtigte Wirkung des Ersatzmaterials erforderlichen Wirksubstanzen im entnommenen

15 Knochen. Eine Gewinnung von geeignetem Knochen ist damit bislang nur unmittelbar bzw. wenige Stunden post mortem möglich, wie z.B. aus Multiorganspendern. Die Zahl an Multiorganspendern ist sehr gering und erlaubt keine Gewinnung von Ausgangsmaterial für Material im Sinne der Erfundung mit dem Zwecke einer zuverlässigen und gesicherten Versorgung von Chirurgen. Andere Verstorbene kommen darüber hinaus als Spender praktisch nicht in Frage, da das Einholen einer Erlaubnis zur Gewebeentnahme innerhalb des kurzen Zeitfensters für eine Gewebeentnahme nicht möglich ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Konzentration und die Wirksamkeit der das Knochenwachstum stimulierenden Substanzen unter bestimmten Umständen bis zu 24 Stunden post mortem erhalten bleibt und dadurch eine Entnahme sowohl aus hirntoten Spendern wie aus normal Verstorbenen möglich ist.

20

25

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial zu schaffen, das den Heilungsprozeß nach einer Implantation beschleunigt.

- 5 Die Lösung dieser Aufgabe erfolgt durch die Merkmale des Anspruchs 1 und insbesondere dadurch, daß die Verweilzeit des Knochenmaterials in der Pufferlösung 24 Stunden nicht überschreitet. Überraschenderweise hat sich nämlich herausgestellt, daß die bislang als vorteilhaft angesehene Verweilzeit von 72 Stunden weder erforderlich noch vorteilhaft ist, um das
- 10 Knochenmaterial zu präparieren und um die für den Heilungsprozeß wesentlichen BMPs zu erhalten. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Verträglichkeit des Knochenmaterials im lebenden Gewebe des Empfängers des Knochenimplantates verbessert und die Wirksamkeit bzw. Freisetzung der im knöchernen Träger enthaltenen Substanzen, die eine
- 15 Knochenregeneration in einem Knochendefekt stimulieren können, werden verbessert, wodurch eine beschleunigte Heilung erreicht wird.

- Erfindungsgemäß bleibt die natürlichen Knochensubstanz als Träger der Wirkstoffe und als Gerüstsubstanz zum biomechanisch korrekten Einbau
- 20 weitgehend erhalten. Die vorliegende Erfindung verbessert die Behandlung des Leichenknochens jedoch derart, daß bestimmte Behandlungsschritte verkürzt und damit der Zeitverlauf des Abbaus der biologisch aktiven Inhaltsstoffe im Knochen vermindert werden.
- 25 Erfindungsgemäß besitzen die das Knochenwachstum stimulierenden, natürlichen Substanzen, die aus der Gerüstsubstanz des erfindungsgemäß behandelten Knochens erhalten werden, eine erhöhte Wirksamkeit gegenüber dem bisherigen Verfahren. Der Nachweis der verbesserten

Wirksamkeit erfolgt durch eine Implantationstest mit Ratten. Die Implantation des erfindungsgemäß behandelten Knochens in die Muskulatur von Ratten führt zur Erzeugung von Knochen- und Knorpelvorläuferzellen sowie zur Bildung von ausdifferenzierten Knochen- und Knorpelzellen. Die 5 Bildung dieser Zellen ist semi-quantitativ auswertbar und ist durch die Menge bzw. durch den zeitlichen Anstieg der alkalischen Phosphataseaktivität ein Maß für die Aktivität der biologischen Inhaltsstoffe.

Weiter bleibt erfindungsgemäß die natürliche Knochensubstanz erhalten, 10 die vom Empfängerorganismus als verträglich erkannt wird und im Verlaufe der Einheilung in körpereigenes Gewebe umgebaut wird. Ein wesentliches Element der Erfindung besteht dabei darin, daß die Chemikalien zur Bearbeitung des Ausgangsmaterials biologisch nicht stören und die Einheilung nicht behindern.

15 Gemäß der Erfindung bewirken die eingesetzten Chemikalien zur Demineralisierung der Gerüstsubstanz und zur Extraktion der zellulären Bestandteile gleichzeitig eine chemische Sterilisation, so daß eine akzidentelle Kontamination des Knochens durch Mikroben, entstanden im Verlaufe der Knochenentnahme oder während des Herstellungsverfahrens, 20 durch das Behandlungsverfahren selbst beseitigt wird. Die Gewinnung des Knochens aus dem Leichenspender innerhalb einer 24-stündigen Frist erfolgt unter aseptischen Bedingungen. Damit kann eine Verkeimung durch Sporen im Spendergewebe ausgeschlossen werden. Eine Verkeimung durch vegetative Keime, wie sie in einem nachfolgenden Bearbeitungsverfahren zufällig oder durch nicht steril / aseptisch geführte Arbeitsgänge erfolgen kann, wird durch die verfahrensgemäße Anwendung 25 der eingesetzten Chemikalien beseitigt. Eine terminale Sterilisation wie

z.B. durch Hitze oder Gas, wie sie zur Herstellung anderer pharmazeutischer Produkte eingesetzt wird, ist nicht obligatorisch, so daß die Inhaltsstoffe des demineralisierten Knochens vollständig erhalten werden können.

5

Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung sind in der Beschreibung und in den Unteransprüchen beschrieben.

So beträgt bei einer ersten vorteilhaften Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens die Verweilzeit nicht mehr als 10 Stunden, vorzugsweise etwa 6 Stunden. Durch eine solche, im Vergleich zum Stand der Technik drastisch reduzierte Verweilzeit in der Pufferlösung wird die biologische Aktivität des erhaltenen Knochenmaterials deutlich gesteigert, ohne daß es jedoch erforderlich oder vorteilhaft wäre, eine erhöhte Konzentration an Enzyminhibitoren zuzugeben.

Auch ist es vorteilhaft, wenn der Demineralisierung eine Entfettung vorangeht. Hierbei ist jedoch eine Mischung aus Chloroform und Methanol als verwendetes Lösungsmittel physiologisch bedenklich, da bereits geringe Rückstände das Einheilungsverhalten beeinträchtigen können und darüber hinaus die Verwendungsmöglichkeit von Chloroform in einem pharmazeutischen Herstellungsverfahren aus arbeitsschutzrechtlichen Gründen mit erheblichen Beschränkungen verbunden ist. Der Ersatz des vorbekannten Entfettungsmittelgemisches Chloroform / Methanol durch andere Entfettungsmittel, z.B. Methanol allein, Chloroform allein, Ethanol, Äther, Azeton und andere Niedrigsieder und Gemische daraus bevorzugt Äther, ermöglicht eine verbesserte, rückstandsfreie Entfernung aus dem

Knochengewebe und eine verbesserte Verträglichkeit des Knochenersatzmaterials.

Besonders vorteilhaft ist es ferner, wenn das erhaltene Knochenmaterial

5 am Ende der Prozeßfolge einer Gamma-Sterilisation unterworfen wird, da hierdurch ohne Einfluß auf die biologische Aktivität eine Sterilisierung des Materials erfolgen kann.

Nachfolgend wird die vorliegende Erfindung beispielhaft anhand einer

10 vorteilhaften Ausführungsvariante beschrieben.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial sowie der Herstellung von knöchernen Defekten in der Chirurgie wird zunächst humaner, kortikaler Knochen, z.B. vom Femur, Tibia, Humerus oder kortikaler Knochen des Beckenkamms sowie des Craniums

15 von geeigneten Spendern unter sterilen Bedingungen innerhalb von 6 Stunden post mortem und bei -80°C gelagert. Der gefrorene Knochen wird zur Bearbeitung in sterilem Wasser mit 2 mmol/l Natriumazid aufgetaut. Das Natriumazid dient als Enzyminhibitor um einen Abbau der osteoinduktiven Knochenmatrixproteine zu unterbinden. Die Knochenenden bzw.

20 Gelenkansätze werden entfernt und der Knochen wird befreit von anhaftendem, nicht ossärem Gewebe und eventuell vorhandenes Knochenmark wird entfernt. Für Zwischenlagerungen während dieses Vorgangs wird der Knochen in destilliertem Wasser mit 2 mmol/l Natriumazid, 2 mmol/l N-

25 Ethylmaleimid und 0,1 mmol/l Benzamidin-Hydrochlorid bei 4°C gelagert und auf diese Weise eine enzymatische Aktivität unterbunden. Alternativ kann die Lagerung beispielsweise auch in 10 mmol/l Natriumazid und 3mmol/l N- Ethylmaleimid bei 4°C erfolgen.

Anschließend erfolgt eine Entfettung in einem Chloroform/Methanol-Gemisch (1:1) bei Raumtemperatur über etwa 4 Stunden.

- 5 Nach einer Verdampfungszeit (Evaporierungszeitraum) von etwa 1 Stunde wird der Knochen zur Demineralisation in 0,6 mol/l Salzsäure bei 4°C eingelegt. Der Grad der Demineralisation ist abhängig von der Zeitspanne und dem Verhältnis zwischen dem mineralischen Gewicht und dem Volumen der Salzsäure. Dauer der Salzsäurebehandlung und damit Grad der
- 10 Demineralisation liegen zwischen wenigen Stunden für eine Oberflächendemineralisierung und bis zu 30 Stunden für eine vollständige Demineralisation. Dabei löst die Salzsäure auch säurelösliche Proteine heraus wie Knochen-Sialoprotein, Osteopontin, Osteonectin, Osteocalcin, und Thrombospondin. Die Behandlung mit Salzsäure ermöglicht die Diffusion
- 15 der BMPs in das Empfängergewebe post implantationem und erleichtert Osteoinduktion und Resorption durch Makrophagen und Osteoklasten.

Nach der Demineralisation wird der Knochen erneut einer Säuberung auf eventuelle Gewebereste auf der Knochenoberseite unterzogen und in sterilem, destilliertem Wasser bei 4°C für 30 - 60 Minuten gewaschen. Durch Inkubation in 0,1 mol/l Phosphat-Puffer, pH 7,4, mit 3 mmol/l N-Ethylmaleimid und 10 mmol/l Natriumazid zur Erhaltung der osteoinduktiven Matrixproteine wird ein autolytischer Abbau der Knochenzellen durchgeführt. Die Behandlung erfolgt bei 37°C unter Schütteln über etwa

- 20 25 6 Stunden in einem Wasserbad. Ein Wechsel der Pufferlösung kann erfolgen. Anschließend wird der Knochen in sterilem, deionisiertem Wasser für 2 bis 4 Stunden bei 4°C gerührt. Das Wasser wird für diesen Vorgang zweimal gewechselt.

Es folgt eine Schrumpfung der Kollagenfibrillen und die Extraktion hochmolekularer Proteoglykane mittels 6 mol/l Lithiumchlorid sowie die Extraktion von Protein-Polysacchariden mit geringem Molekulargewicht 5 wie Biglykanen, Dekorin, Fibromodulin etc. durch 0,3 mol/l Calciumchlorid. Die Lösung enthält 3 mmol/l Natriumazid und die Extraktion wird über 24 Stunden bei 4°C durchgeführt.

Der Knochen wird anschließend in sterilem destillierten Wasser für 12 10 Stunden bei 4°C gewaschen, wobei ein mehrfacher Wasserwechsel durchgeführt wird. Lipide sowie Lipoproteine der Zellmembran werden über 24 Stunden mittels einer 1:1 Mischung aus Chloroform-Methanol extrahiert. Ein zusätzlicher Effekt dieser Behandlung besteht in der Inhibition sowie 15 Extraktion endogener, BMPs abbauender Enzyme. Nach Abgießen der Chloroform-Methanolösung wird der Knochen unter sterilen Bedingungen getrocknet. Schließlich wird der Knochen wiederum mit sterilem, deionisierten Wasser für 4 Stunden bei 4°C gewaschen und anschließend tiefgefroren und danach für 10 Tage lyophilisiert und schließlich steril verpackt. Hieran kann sich noch eine Gamma-Sterilisation anschließen.

20

In Stichworten gestaltet sich das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren für Knochenstücke wie folgt:

- 1 Bei -80°C tiefgefroren gelagerten Knochen in Aqua dest. mit 2,0 mM 25 Natriumazid auftauen.
- 2 Knochenenden entfernen.
- 3 Knochen von Weichgeweben befreien.
- 4 Knochenstücke mittels Kürette von Knochenmark befreien.

- 5 Knochen in gewünschte Größe sägen.
- 6 Knochen mit starkem, kaltem Wasserstrahl von Knochenmark befreien, Knochen nicht austrocknen lassen, in Aqua dest, 4°C, mit 2,0 mM Natriumazid 2,0 mM N-Ethylmaleinimid und 0,1 mM Benzamidin-HCl lagern.
- 7 Entfetten durch ein Bad in Chloroform/Methanol 1:1 bei RT, 4 h.
- 8 Evaporieren für ca 1 h.
- 9 Demineralisierung mit 0,6 M HCl bei 4°C für 2 bis 16 h je nach gewünschtem Demineralisierungsgrad (am nächsten Tag Röntgenkontrolle).
- 10 Oberste Schicht des demineralisierten Knochens und noch anhaftendes Weichgewebe entfernen.
- 11 Waschen mit Aqua dest. bei 4°C für 1 h.
- 12 Knochen für 6 h in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 3,0 mM N-ethylmaleinimid und 10,0 mM Natriumazid bei 37°C im Wasserbad inkubieren.
- 13 Mit Aqua dest, für 2-4 h bei 4°C waschen und das Aqua dest. zweimal wechseln.
- 14 Für 24 Std mit 6,0 M LiCl/0,3 M CaCl<sub>2</sub> mit 3,0 mM Natriumazid bei 4°C inkubieren.
- 15 Mit Aqua dest. 12 bis 24 h bei 4°C waschen und das Aqua dest. mindestens zweimal wechseln.
- 16 Abtöten von Keimen und Sporen durch Desinfektion bzw. Chemo-Sterilisation sowie Extraktion zellulärer Abbauprodukte mittels Chloroform/Methanol (1:1) bei Raumtemperatur für 24 h.
- 17 Evaporieren für ca. 2-3 h.
- 18 Mit steriles Aqua dest. für 4 h bei 4 °C waschen, das Wasser zweimal wechseln.

- 19 Lyophilisieren für 10 Tage; anschliessend Sterilproben prüfen.
- 20 Knochenstücke steril verpacken.
- 21 Eventuell Sterilisierung mittels Gamma-Sterilisation bei 3 MRad.

5 Es sei darauf hingewiesen, daß die oben genannten Schritte 10 bis 18 grundsätzlich in ihrer Reihenfolge vertauscht werden können.

Ein Herstellungsverfahren für Knochenpulver gestaltet sich gemäß der Erfindung wie folgt:

- 10
  - 1 Knochen in Aqua dest. Mit 2,0 mM Natriumazid (0,13 g auf 1 l) auftauen.
  - 2 Knochen von Weichgewebe befreien.
  - 3 Knochen in kleine Stücke sägen.
- 15 4 Knochenstücke von Knochenmark befreien und unter kaltem Wasser nochmals säubern.
- 5 Knochen nicht austrocknen lassen, in Aqua dest, 4°C, mit 10,0 mM Natriumazid 3,0 mM N-Ethylmaleimid lagern.
- 6 Mit der Knochenmühle unter Verwendung von flüssigem Stickstoff grob mahlen (ca. 2,0 mm Korngröße).
- 20 7 Entfetten durch ein Bad in Chloroform/Methanol 1:1 bei RT, für 1 bis 4 h.
- 8 Evaporieren für ca 1 h.
- 9 Auf die gewünschte Größe (ca 0,5 mm Korngröße) mahlen unter Kühlung, z.B. durch flüssigen Stickstoff.
- 25 10 Demineralisierung mit 0.6 N HCl bei 4°C über Nacht (am nächsten Tag Röntgenkontrolle).
- 11 Waschen mit Aqua dest. bei 4° C für 1 h.

- 12 Pulver für 6 Stunden in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 3,0 mM N-ethylmaleimid und 10,0 mM Natriumazid bei 37° C im Wasserbad inkubieren.
- 13 Mit Aqua dest. 10 mM Natriumazid und 3,0 mM N-Ethylmaleimid für 4 h bei 4°C waschen und das Aqua dest. zweimal wechseln.  
5
- 14 Für 24 h mit 6,0 M LiCl /0,3 M CaCl<sub>2</sub> mit 3,0 mM Natriumazid bei 4°C inkubieren.
- 15 Mit Aqua dest. 10 mM Natriumazid und 3,0 mM N-Ethylmaleimid den ganzen Tag bei 4°C waschen und Aqua dest. mindestens zweimal wechseln.  
10
- 16 Abtöten von Keimen und Sporen durch Desinfektion bzw. Chemo-Sterilisation sowie Extraktion zellulärer Abbauprodukte mittels Chloroform/Methanol (1:1) bei Raumtemperatur für 24 h.
- 17 Evaporieren für ca 1 h.
- 18 Mit sterilem Aqua dest. für 1 h bei 4° C waschen.  
15
- 19 Lyophilisieren.
- 20 Nach 10 Tagen Sterilproben prüfen.
- 21 Pulver steril verpacken.
- 22 Eventuell Sterilisierung mittels Gamma-Sterilisation bei 3 MRad.  
20

Auch hier sind die oben genannten Schritte 11 bis 18 grundsätzlich in ihrer Reihenfolge vertauschbar.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen den Einfluß verschiedener Verfahrensparameter auf die Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphatase (AP)).  
25

Tabelle 1A zeigt die Abhängigkeit der Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphataseaktivität (AP)) nach 10- bzw. 15-tägiger Implantation sowie

der osteoinduktiven Potenz nach 4-wöchiger heterotroper, d.h. intramuskulärer Implantation in Ratten von der Expositionsdauer des AAA-Knochens gegenüber Phosphatpuffer in Kombination mit den genannten Enzyminhibitoren (3,0 mmol/l N-Ethylmaleimid und 10 mmol/l Natriumazid bei 37°C) während der Autolyse:

**Tabelle 1A**

Einwirkzeit (Std.) von 0,1 mol/l Na-Phosphat, pH 7,4	AP (U) 10 Tage $\bar{X} \pm SD$ (n)	AP (U) 15 Tage $\bar{X} \pm SD$ (n)	Histologie / Osteoinduktion
-	41.4 ± 5.7 (6)	68.4 ± 4.9 (5)	5/6
6	-	76.0 ± 9.9 (6)	3/4
24	22.5 ± 4.9 (6)	28.3 ± 6.8 (6)	4/6
72	14.6 ± 3.5 (6)	12.2 ± 3.1 (6)	6/6
168	5.5 ± 1.2 (6)	7.5 ± 2.6 (6)	5/6

Wie Tabelle 1A zeigt, wirkt sich eine über 6 Stunden hinausgehende Einwirkzeit in der Phosphatpufferlösung nicht vorteilhaft auf die Osteoblastenaktivität aus. Zudem kann durch eine Verringerung der bislang gewählten Einwirkzeit von 72 Stunden auf 6 Stunden eine Steigerung der Osteoblastenaktivität auf das über 6-fache erzielt werden (nach 15-tägiger Implantation).

Tabelle 1B zeigt die Abhängigkeit der Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphatase (AP)) nach 10- bzw. 15-tägiger Implantation sowie der osteoinduktiven Potenz nach 4-wöchiger heterotroper, d.h. intramuskulärer Implantation in Ratten von der Expositionsduauer des AAA-Knochens gegenüber der neutralen Phosphatpufferlösung in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen an Enzyminhibitoren:

Tabelle 1B

Konzentration Enzyminhibitoren	Einwirkzeit (Std) 0,1 mol/l Na- Phosphat, pH 7,4	AP (U) 10 Tage		AP (U) 15 Tage $\bar{X} \pm SD$ (n)	Histologie Osteoinduktion
			$\bar{X} \pm SD$ (n)		
3 mmol/l N-ethylmaleimid	6	-	-	76.0 ± 9.9 (6)	3 / 4
	24	22.5 ± 4.9 (5)	-	28.3 ± 6.8 (6)	4 / 6
	72	14.6 ± 3.5 (6)	-	12.2 ± 3.1 (6)	6 / 6
	168	5.5 ± 1.2 (5)	-	7.5 ± 2.6 (6)	5 / 6
10 mmol/l Natriumazid	6	-	-	71.8 ± 13.1 (4)	4 / 4
	24	-	-	22.5 ± 4.9 (5)	2 / 3
	72	-	-	20.3 ± 5.8 (5)	2 / 3
	168	-	-	6.5 ± 1.2 (6)	3 / 4
30 mmol/l N-ethylmaleimid	6	-	-	47.3 ± 23.1 (5)	4 / 4
	24	-	-	13.7 ± 1.9 (6)	4 / 4
	72	-	-	8.3 ± 0.8 (5)	4 / 4
	168	-	-	4.7 ± 0.6 (6)	2 / 4
100 mmol/l Natriumazid	6	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	72	-	-	-	-
	168	-	-	-	-
300 mmol/l N-ethylmaleimid	6	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	72	-	-	-	-
	168	-	-	-	-
1000 mmol/l Natrium- zid	6	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	72	-	-	-	-
	168	-	-	-	-

Wie Tabelle 1B zeigt, wird die Osteoblastenaktivität durch eine erhöhte Konzentration an Enzyminhibitoren während der Autolyse in neutraler Phosphatpufferlösung nicht gesteigert. Auch wirkt sich eine über 6 Stunden hinausgehende Einwirkzeit in der Phosphatpufferlösung nicht positiv auf die Osteoblastenaktivität (nach 15-tägiger Implantation) aus.

Tabelle 2 zeigt den Einfluß von Lösungsmittelgemischen, eingesetzt zur Entfettung und Chemosterilisation, auf die Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphatase (AP) und Osteoinduktion) nach 4-wöchiger heterotroper, d.h. intramuskulärer Implantation in Ratten sowie der Chondroinduktion nach 14-tägiger Einwirkung auf neonatale Rattenmuskulatur in vitro:

Tabelle 2

Chemosterilisation 24 h mit 50% Methanol und 50%	AP (U) 10 Tage $\bar{X} \pm SD$ (n)	Histologie Osteoinduktion	Chondroinduktion in vitro
Chloroform	55.9 $\pm$ 24.8 (6)	12/15	4/6
Aceton	10.3 $\pm$ 2.8 (6)	12/22	1/3
Äther	18.2 $\pm$ 4.7 (5)	11/16	8/8

20  
Ansprüche

1. Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial zur Wiederherstellung von knöchernen Defekten in der Chirurgie, umfassend folgende Schritte:
  - Demineralisieren von vorzugsweise kortikalem Knochenmaterial,
  - autolytischer Abbau der Knochenzellen des demineralisierten Knochenmaterials unter Erhaltung der osteoinduktiven Matrixproteine durch Waschen in einer Phosphatpufferlösung unter Zuführung von Enzym-inhibitoren,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Verweilzeit in der Pufferlösung 24 Stunden nicht über-schreitet.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Verweilzeit nicht mehr als etwa 10 Stunden, vorzugsweise etwa 6 Stunden beträgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß der Demineralisierung eine Entfettung, vorzugsweise unter Verwendung einer Methanolmischung, vorausgeht.
4. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß sich an die Demineralisierung eine Chemosterilisation, vor-

zugsweise unter Verwendung einer Methanolmischung, anschließt.

5. 5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
die Methanolmischung neben Methanol Äther oder Chloroform  
aufweist.
- 10 6. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
das erhaltene Knochenmaterial einer Gamma-Sterilisation un-  
terworfen wird.
- 15 7. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
das Knochenmaterial vor der Demineralisierung unter Verwen-  
dung von flüssigem Stickstoff zu Pulver gemahlen wird.
- 20 8. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
das Knochenmaterial vor der Demineralisierung ohne Erhitzung  
über 40°C zu Pulver gemahlen wird.
- 25 9. Knochenmaterial, erhältlich durch ein Verfahren nach  
zumindest einem der vorstehenden Ansprüche.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/08056

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7 A61L27/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 112 354 A (SIRES BRYAN S) 12 May 1992 (1992-05-12) column 1, line 30 - line 48 column 5, line 34 -column 6, line 55 ---	1-5, 9
Y	WO 96 39203 A (BIOCOLL LAB INC) 12 December 1996 (1996-12-12) page 1, line 17 - line 31 page 23, line 32 -page 24, line 6 ---	6
Y	US 4 472 840 A (JEFFERIES STEVEN R) 25 September 1984 (1984-09-25) column 2, line 38 - line 68 example 1 ---	7, 8
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 February 2000

Date of mailing of the international search report

17/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Diederken, J

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**Inte...nal Application No  
PCT/EP 99/08056**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GLOWACKI, J. ET AL.: "Demineralized Bone Implants" CLINICS PLASTIC SURGERY, vol. 12, no. 2, April 1985 (1985-04), pages 233-241, XP000874409 page 235, column 2, line 18 -page 236, column 2, line 9 -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/08056

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5112354	A	12-05-1992	NONE		
WO 9639203	A	12-12-1996	AU	6107496 A	24-12-1996
			CA	2222626 A	12-12-1996
			CN	1192700 A	09-09-1998
			EP	0851772 A	08-07-1998
US 4472840	A	25-09-1984	US	4394370 A	19-07-1983

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/08056

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 A61L27/36

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 A61L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 112 354 A (Sires Bryan S) 12. Mai 1992 (1992-05-12)	1-5, 9
Y	Spalte 1, Zeile 30 - Zeile 48 Spalte 5, Zeile 34 - Spalte 6, Zeile 55 ---	6-8
Y	WO 96 39203 A (BIOCOLL LAB INC) 12. Dezember 1996 (1996-12-12) Seite 1, Zeile 17 - Zeile 31 Seite 23, Zeile 32 - Seite 24, Zeile 6 ---	6
Y	US 4 472 840 A (JEFFERIES STEVEN R) 25. September 1984 (1984-09-25) Spalte 2, Zeile 38 - Zeile 68 Beispiel 1 ---	7, 8
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

9. Februar 2000

17/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Diederer, J

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/08056

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	GLOWACKI, J. ET AL.: "Demineralized Bone Implants" CLINICS PLASTIC SURGERY, Bd. 12, Nr. 2, April 1985 (1985-04), Seiten 233-241, XP000874409 Seite 235, Spalte 2, Zeile 18 -Seite 236, Spalte 2, Zeile 9 -----	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08056

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5112354 A	12-05-1992	KEINE	
WO 9639203 A	12-12-1996	AU 6107496 A CA 2222626 A CN 1192700 A EP 0851772 A	24-12-1996 12-12-1996 09-09-1998 08-07-1998
US 4472840 A	25-09-1984	US 4394370 A	19-07-1983